

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 717 499**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **94 03125**

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 N 15/70, C 12 P 21/08, G 01 N 33/577

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 17.03.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 22.09.95 Bulletin 95/38.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
(U.L.P.) Etablissement Public à caractère Scientifique,
Cultural et Professionnel selon Loi de l'Enseignement
Supérieur no 8452 du 26 janvier 1984 — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Weiss Etienne, Chatellier Jean et
Orfanoudakis Georges.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Armengaud Jeune Cabinet Lepeudry.

⑤4 Fragments d'anticorps recombinants synthétisés et biotinylés dans E. coli, leur utilisation en immunodosages et en purification par immunoaffinité.

⑤7 L'invention concerne l'obtention de fragments Fab d'anticorps recombinants exprimés dans E. coli, dont la partie Fd est biotinylée in vivo suite à la fusion de la région codante de l'anticorps avec celle d'un récepteur de biotine.
L'invention concerne aussi l'exploitation du caractère bifonctionnel de ces fragments d'anticorps biotinylés pour la réalisation de dosages immunologiques et pour le développement de méthodes d'immuno-purification d'antigènes.

FR 2 717 499 - A1



La présente invention concerne l'obtention de fragments d'anticorps recombinants, Fab, exprimés dans
5 E. coli, dont la partie Fd est biotinylée in vivo, suite à la fusion de la région codante de l'anticorps à celle d'un récepteur de biotine. L'invention concerne également l'exploitation du caractère bifonctionnel desdits fragments d'anticorps biotinylés, d'une part pour la réalisation de
10 dosages immunologiques, d'autre part pour le développement de méthodes d'immunopurification d'antigènes.

L'utilisation de molécules biotinylées en immunologie est largement répandue à cause de leur facilité de détection qui repose sur la forte affinité de la biotine
15 pour l'avidine et la streptavidine. Ces dernières sont utilisées sous forme complexée à une enzyme qui donne lieu à une réaction colorée et quantifiable, en présence de son substrat. Ainsi la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline est couramment utilisée.

20 Dans les diverses techniques immunologiques de détection, de dosage, de marquage ou de purification, l'utilisation d'anticorps biotinylés assure une très grande sensibilité.

D'une manière générale, la biotinylation des
25 anticorps est effectuée chimiquement et la biotine se lie au hasard, ce qui fournit un conjugué hétérogène.

La biotine est un petit coenzyme qui est présent, in vivo, sous forme liée à des protéines intracellulaires dont les activités enzymatiques participent à des réactions
30 de carboxylation essentielles au métabolisme cellulaire.

Contrairement aux cellules eucaryotes, E. coli ne contient qu'une seule protéine biotinylée qui est une sous-unité de l'acétyl-CoA-carboxylase, la protéine porteuse de carboxy-biotine, qui sera désignée ci-après par BCCP (pour
35 "biotin carboxyl carrier protein" - selon Fall et Vagelos, 1973, J. Biol. Chem. 248, 2078-2088-).

Le gène de la BCCP a été cloné par Li et Cronan

(J. Biol. Chem. 267, 1992, 855-863) qui ont aussi démontré que l'expression dans E. coli d'une protéine de fusion comprenant la séquence de l'accepteur de biotine de la BCCP (c'est-à-dire la séquence comprenant de 84 à 110 acides aminés de l'extrémité C-terminale) permet une fixation efficace de la biotine sur ladite protéine. Cette séquence tronquée et suffisante sera désignée BCCP*, ci-après.

La Demanderesse a tiré avantage de cette découverte pour concevoir des constructions génétiques utilisant cette séquence d'ADN et des séquences codantes de fragments Fab d'anticorps pour mettre au point un système de biotinylation in vivo des anticorps.

Ainsi la présente invention concerne un vecteur de clonage et d'expression portant une cassette d'expression bi-cistronique permettant la synthèse dans E. coli de fragments Fab d'anticorps de spécificité définie et comprenant un site fonctionnel de liaison de l'antigène (semblable au vecteur modèle décrit par Orfanoudakis, Karim, Bourel et Weiss, 1993, Mol. Immunol. 30, 1519-1528), dans lequel on a inséré une séquence d'ADN codant pour l'extrémité C-terminale de la sous-unité BCCP de E. coli, en phase, en aval de la séquence codante du fragment Fd dudit anticorps. Ainsi, dans les conditions appropriées d'induction, cette construction permet la synthèse d'une protéine de fusion Fd-BCCP* et ensuite sa liaison au fragment de chaîne légère du même anticorps, codée par le même vecteur, pour former le Fab-BCCP* qui comprend ladite protéine de fusion.

La construction selon la présente invention permet de récupérer le fragment d'ADN codant pour la BCCP* avec les enzymes de restriction qui ont été utilisés pour son insertion et ensuite de le transférer dans un autre vecteur dans lequel des fragments choisis d'un anticorps quelconque ont été clonés et qui présente une même zone de jonction avec les sites de restriction nécessaires.

La présente invention concerne également les fragments Fab d'anticorps synthétisés et sécrétés par des

bactéries E. coli transformées par le vecteur décrit plus haut. C'est un autre objet de l'invention de démontrer que les fragments Fab d'anticorps ainsi obtenus sont bifonctionnels, l'extrémité N-terminale constituant le site de liaison de l'antigène et l'extrémité C-terminale constituant le site de liaison de la biotine, et que cette bifonctionnalité peut être exploitée pour mettre au point de nouveaux tests d'immunodosage et de nouvelles méthodes d'immunopurification.

10 La fusion de la séquence BCCP* à l'extrémité du fragment Fd de l'anticorps entraîne la biotinylation de celui-ci, in vivo, dans la bactérie. Le taux de fixation de la biotine peut être optimisé par l'addition de biotine à une concentration d'environ 0,1 mM dans le milieu de culture des bactéries. La biotine ainsi liée aux fragments d'anticorps a gardé son affinité pour l'avidine et la streptavidine, et cette propriété est la base des applications suivantes des fragments d'anticorps obtenus.

C'est un autre objet de la présente invention d'utiliser les fragments d'anticorps biotinylés in vivo pour la réalisation de dosages immunologiques dans lesquels la bi-fonctionnalité de la protéine de fusion Fab-BCCP* est exploitée pour fixer l'antigène à l'extrémité N-terminale (qui correspond au site naturel de fixation de l'antigène sur l'anticorps choisi) et pour détecter et quantifier la liaison antigène-anticorps par la révélation de la biotine liée à l'extrémité C-terminale de la protéine de fusion. La biotine est révélée par l'addition d'avidine ou de streptavidine, couplée à un marqueur enzymatique donnant une réaction colorée en présence de son substrat, comme la phosphatase alcaline, ou à un isotope radioactif. L'invention permet ainsi de réaliser tous les tests classiques d'immunodétection de type ELISA, RIA, etc..., directs ou indirects. L'invention peut également être appliquée au domaine de l'imagerie médicale, les anticorps marqués par un isotope radioactif pouvant être détectés, in vivo, par immunoscintigraphie.

C'est aussi un autre objet de la présente invention d'utiliser les fragments d'anticorps biotinylés *in vivo* pour purifier des antigènes par immunoaffinité. Dans ce cas, la bifonctionnalité de la protéine de fusion
5 Fab-BCCP* est exploitée pour fixer l'anticorps par son extrémité biotinylée sur un support inerte, par exemple de type bille d'agarose ou de polymère de synthèse, recouvert d'avidine ou de streptavidine. L'affinité de ces dernières pour la biotine entraîne la fixation de la protéine de
10 fusion par son extrémité C-terminale et la présentation, vers l'extérieur, du site de reconnaissance de l'antigène, situé en N-terminal. Ce site, libre, permet la rétention de l'antigène à partir de toute solution brute dans laquelle il est présent (milieu de culture ou fluide biologique...). On
15 peut ainsi réaliser l'immunopurification en lot ("batch") ou sur colonne de billes immobilisées, l'antigène adsorbé étant ensuite élué dans des conditions appropriées.

Les exemples suivants illustrent la mise en oeuvre de la présente invention dans un modèle choisi, comprenant
20 un anticorps monoclonal choisi, dirigé contre le facteur de nécrose tumorale (TNF) humain, dont le clonage et l'expression d'un fragment Fab fonctionnel ont déjà été décrits. (Orfanoudakis, Karim, Bourel et Weiss, 1993, Mol. Immunol. 30, 1519-1528).

25 Il est évident que l'invention ne se limite pas à ce modèle et que des constructions semblables peuvent être réalisées avec tout fragment Fab d'un anticorps choisi et cloné dans le même vecteur, par la fusion avec la même séquence codante BCCP* et que les mêmes applications des
30 protéines de fusion peuvent être développées.

La figure 1 représente schématiquement le vecteur d'expression pHL4-bio qui est décrit dans l'exemple 1 et qui dérive du pHL4 par l'insertion de la séquence codante BCCP*.
35 Le vecteur pHL4 est décrit dans la publication de Orfanoudakis et al. (citée plus haut) et comprend les séquences codantes V_H-CH1 (Fd) de la chaîne lourde et V_L-CK

de la chaîne légère de l'anticorps monoclonal n° 4 anti-TNF. Ces 2 séquences codantes constituent un opéron bicistronique mis sous le contrôle du promoteur Lac et de la séquence "leader" et du peptide signal de la lyase de pectate bactérienne.

Les sites de restriction utilisés pour la construction sont indiqués.

Les abréviations suivantes sont utilisées :

ori : origine de répllication de ColE1

10 Lac Z : gène de la β -galactosidase

fl IG : région intergénique du phage fl

AmpR : gène de résistance à l'ampicilline.

La figure 2 représente les oligonucléotides conçus comme amorces pour récupérer la séquence codante BCCP* par PCR. Les sites de restriction SpeI et EcoRI sont soulignés.

Exemple 1.

1.A. construction du vecteur d'expression.

20

La séquence codante de la BCCP a été publiée par Li et Cronan (voir plus haut). Elle a été utilisée pour concevoir des amorces (qui sont représentées sur la figure 2) permettant l'amplification par PCR (réaction de polymérase en chaîne) de la séquence correspondant aux 101 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la BCCP de la souche de E. coli 71-18 BMH (Yanish-Perron et al., 1985, Gene 33, 103-109).

L'amorce pour l'extrémité 5' contient un site de restriction Spe I et l'amorce pour l'extrémité 3', un site Eco RI.

Des bactéries E. coli 71-18 BMH provenant d'une culture de nuit en milieu M9 ont été mises en présence d'un mélange réactionnel pour PCR contenant les 2 amorces et ont été soumises à 25 cycles d'amplification, en appareil automatique (Perkin-Elmer/Cetus®).

Les produits de l'amplification, d'une taille

d'environ 350 pb, ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose pour être insérés dans le vecteur pHL4 digéré par Spe I/Eco RI. Ce vecteur, déjà décrit par Orfanoudakis et al. (voir plus haut) et représenté schématiquement sur la figure 1, comporte les séquences codantes V_H-CH1 (ou Fd) et V_L-CK du fragment Fab d'un anticorps monoclonal murin choisi, dressé contre le TNF. Ces séquences sont alignées sous forme d'un opéron bi-cistronique placé sous le contrôle du promoteur Lac. Elles sont séparées par 21 nucléotides de jonction qui permettent l'insertion d'une séquence codante étrangère, en aval de la séquence Fd.

Dans le présent exemple, la séquence BCCP* est insérée entre les sites Spe I et Eco RI ce qui la place en phase, en aval de la séquence Fd. La construction est vérifiée par séquençage. Le vecteur résultant a été appelé pHL4-bio (parce qu'il code pour l'accepteur de biotine).

1.B. Caractérisation des protéines exprimées par les bactéries transformées par pHL4-bio.

Des colonies isolées de E. coli 71-18 BMH transformées par pHL4 ou par pHL4-bio ont été mises en culture en milieu LB à 30°C pendant une nuit. Les protéines sécrétées dans le milieu de culture après induction du promoteur Lac par l'IPTG 1 mM (isopropyl- β -D-thiogalactoside) ont été récupérées après centrifugation du culot cellulaire et concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium. Elles ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et immunoempreintes sur filtres de nitrocellulose.

Pour réaliser les immunoempreintes on utilise des anticorps de chèvre biotinylés, dirigés contre les chaînes kappa d'anticorps de souris, et de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline.

Pour détecter les protéines biotinylées on utilise de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline.

Les anticorps anti-kappa reconnaissent un composé

d'environ 80 kDa et de 50 kDa dans les protéines sécrétées par les bactéries transformées respectivement par pHL4-bio et par pHL4. Quand des aliquots des mêmes protéines sont incubés en présence de streptavidine marquée à la
5 phosphatase alcaline, celle-ci se lie fortement au composé de 80 kDa identifié par les anti-kappa, alors qu'elle ne réagit pas avec les protéines de 50 kDa.

(On détecte aussi une faible bande à 22 kDa qui correspond à la BCCP produite naturellement par la bactérie-
10 hôte).

La même analyse a été réalisée en présence de β -mercaptoéthanol. Dans ces conditions, avec la streptavidine marquée, on ne détecte aucune protéine dans le surnageant de pHL4 et une protéine de 40 kDa dans le surnageant de pHL4-
15 bio (40 kDa correspondant à la masse approximative calculée pour la protéine de fusion Fd-BCCP*).

Des quantités identiques de fragments de chaînes L sont détectées par les anti-kappa dans les 2 surnageants.

L'ensemble de ces résultats indique que les
20 bactéries transformées par pHL4-bio produisent une protéine complexe comprenant le fragment Fd-BCCP* lié par un pont disulfure à la chaîne légère (V_L) et que cette protéine a été efficacement biotinylée in vivo. Cette protéine sera appelée Fab4-BCCP*.

25

Exemple 2. Mise en évidence de la liaison de l'antigène et de la biotine sur la protéine de fusion.

La capacité de fixer l'antigène de la protéine
30 Fab4-BCCP* a été évaluée avec différentes quantités de TNF immobilisé sur filtres de nitrocellulose. (Le TNF utilisé est du TNF α humain recombinant.)

On observe que la protéine Fab4-BCCP* se lie au TNF avec la même efficacité que la Fab4, quand on révèle sa
35 présence par l'addition d'anticorps anti-kappa.

D'autre part quand les mêmes filtres sont révélés en présence de streptavidine marquée à la phosphatase

alcaline, seule la Fab4-BCCP* donne un signal positif.

Cette expérience montre donc que les 2 domaines de la protéine de fusion Fab4-BCCP* sont fonctionnels : le site spécifique de l'anticorps reconnaît son antigène et
5 l'extrémité BCCP* fixe la biotine qui lie la streptavidine.

Pour démontrer que la présence de l'extrémité BCCP* n'interfère pas avec la capacité de fixation de l'antigène par comparaison avec le Fab4, l'interaction Fab4-BCCP*/TNF a été suivie dans un test de compétition en
10 ELISA (voir exemple 4) en présence d'un excès d'antigène. Une quantité définie de Fab4 ou de Fab4-BCCP* et des quantités variables de TNF ont été mélangées dans des puits de microplaques à ELISA recouverts d'antigène. Après lavage, les molécules fixées sont révélées par l'addition de
15 streptavidine marquée à la phosphatase alcaline.

La concentration de TNF libre nécessaire pour provoquer 50 % d'inhibition de la fixation de Fab4-BCCP* est de 0,2 µg/ml ce qui correspond à une constante de liaison relative de $1,2 \cdot 10^{-8}$ M, c'est-à-dire du même ordre que celle
20 de $1,5 \cdot 10^{-8}$ M qui a été trouvée pour Fab4 (publication de Orfanoudakis et al.).

La fusion de l'extrémité BCCP* n'affecte donc pas la capacité de liaison de l'antigène du Fab4.

25 Exemple 3. Optimisation de la biotinylation des molécules de Fab4-BCCP* sécrétées par E. coli.

Le pourcentage de protéines de fusion Fab4-BCCP* marquées par la biotine a été évalué à l'aide de
30 streptavidine immobilisée sur des billes d'agarose. Des quantités non saturantes de surnageant de culture de E. coli ont été incubées avec les billes puis les protéines fixées ont été analysées par immunoempreinte avec de l'anti-kappa. Par comparaison avec la quantité de surnageant incubé on
35 mesure que 3 % des molécules sont biotinylées.

Pour augmenter ce rendement, les cultures bactériennes ont été réalisées en présence de différentes

concentrations de d-biotine (de 0,01 à 1 mM). Celle-ci est ajoutée quand la culture a une D.O. de 1, en même temps que l'IPTG.

5 Dans ces conditions on obtient un rendement 5 fois plus élevé de biotinylation, avec un plateau à partir d'une concentration de 0,1 mM de d-biotine. On obtient ainsi 15 % de Fab-BCCP* biotinylé.

10 Dans les conditions habituelles de production on obtient 1 mg de Fab-BCCP* par litre de culture bactérienne, dont 0,15 mg de molécule biotinylée.

Exemple 4. Utilisation des fragments d'anticorps biotinylés dans des dosages immunologiques.

15 Le concentré de protéines de fusion Fab4-BCCP* peut être utilisé pour réaliser des tests ELISA directs ou indirects.

20 Des microplaques pour dosage ELISA ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec des quantités variables de TNF α recombinant (de 0,01 à 5 μ g/ml en tampon bicarbonate 0,1 M). Après lavage, les plaques ont été incubées pendant 1 heure à température ordinaire en présence de sérumalbumine bovine pour bloquer les sites résiduels de liaison de protéines.

25 Après lavage, des dilutions en série du concentré de Fab4-BCCP* ont été distribuées dans les puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C les protéines de fusion qui se sont adsorbées sur l'antigène sont détectées par une incubation de 1 heure à 37°C en présence de streptavidine
30 marquée à la phosphatase alcaline. Celle-ci est visualisée par l'addition de para-nitrophényl-phosphate (1 mg/ml - Sigma®) en tampon Tris-HCl 0,1 M pH 9, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM et hydrolyse pendant 1 heure. La densité optique des puits est mesurée à 405 nm, par exemple à l'aide d'un
35 lecteur automatique d'ELISA (Molecular Devices®).

La représentation graphique des résultats montre que les protéines Fab4-BCCP* lient spécifiquement le TNF, de

manière saturable. La réactivité est strictement dépendante de la concentration en Fab4-BCCP* utilisée, ce qui confirme la bifonctionnalité de la protéine de fusion puisque toutes les molécules qui fixent la streptavidine sont capables de réagir avec le TNF.

Cette propriété permet d'utiliser la protéine de fusion dans n'importe quel type de dosage par immunodétection.

Exemple 5. Utilisation des fragments d'anticorps biotinylés pour la purification d'antigènes par immunoaffinité.

La bifonctionnalité des protéines Fab-BCCP* biotinylées permet de les adsorber sur des billes couvertes de streptavidine et ensuite, d'utiliser celle-ci pour purifier, par immunoaffinité, l'antigène correspondant au Fab.

Une suspension de 0,25 ml de billes d'agarose recouvertes de streptavidine a été incubée en présence de Fab4-BCCP* concentrés (4 ml) dans 10 ml de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM et sérumalbumine bovine 1 % (tampon A), pendant 1 heure à température ordinaire, sous agitation douce.

Après lavage des billes en tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 0,5 M, NP40 0,1 % puis en tampon Tris-HCl, pH 8, NaCl 50 mM, les billes sont remises en suspension dans le tampon A.

La préparation de billes ainsi recouvertes de streptavidine-biotine-BCCP*-Fab (9,8 ml) a été mise en contact avec un lysat bactérien (0,2 ml) clarifié d'une souche transformée par un vecteur d'expression d'une protéine de fusion comportant le TNF. Après une incubation de 2 heures à 4°C sous agitation douce, puis lavage dans les conditions décrites plus haut, les protéines du lysat bactérien qui se sont adsorbées sur les billes ont été éluées avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 0,50 M,

éthylène glycol 50 %. Ces protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie. Elles correspondent bien à la protéine de fusion attendue.

- 5 Les molécules de Fab-BCCP*-bio sont donc utilisables pour purifier, en une seule étape, un antigène présent dans un extrait brut de bactérie.

REVENDEICATIONS

1.- Vecteur de clonage et d'expression portant une cassette d'expression bi-cistronique permettant la synthèse dans E. coli de fragments Fab d'anticorps de
5 spécificité définie et comprenant un site fonctionnel de liaison de l'antigène, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN codant pour l'extrémité C-terminale de la sous-unité porteuse de carboxy-biotine (BCCP) de l'acétyl-CoA carboxylase de E. Coli, insérée en phase en aval de la
10 séquence codante du fragment Fd desdits fragments Fab d'anticorps, ladite séquence d'ADN permettant, dans les conditions appropriées d'induction, la synthèse d'une protéine de fusion Fd-BCCP* et du Fab-BCCP* qui comprend ladite protéine de fusion.

15 2.- Fragments Fab d'anticorps caractérisés en ce qu'ils sont synthétisés et sécrétés par des bactéries E. coli transformées par un vecteur selon la revendication 1.

3.- Fragments Fab d'anticorps selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils sont
20 bifonctionnels, l'extrémité N-terminale constituant le site de liaison de l'antigène et l'extrémité C-terminale constituant le site de liaison de la biotine.

4.- Fragments Fab d'anticorps selon la revendication 2 ou 3, caractérisés en ce qu'ils ont été
25 biotinylés in vivo par la bactérie qui les a synthétisés.

5.- Procédé d'obtention de fragments Fab d'anticorps selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on optimise le taux de fixation de biotine par addition de biotine à une concentration d'environ 0,1 mM dans le
30 milieu de culture des bactéries.

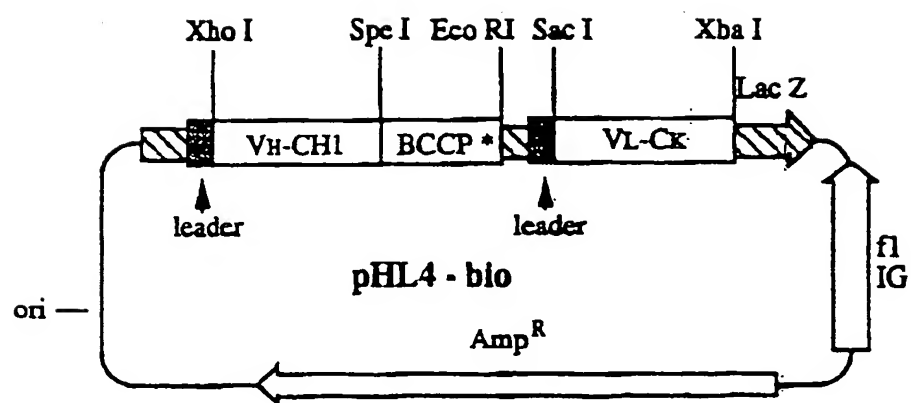
6.- Utilisation des fragments Fab d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 2 à 5 pour la réalisation de dosages immunologiques dans lesquels la bi-fonctionnalité de la protéine de fusion Fab-BCCP* est
35 exploitée pour fixer l'antigène à l'extrémité N-terminale et détecter et quantifier la liaison antigène-anticorps par la révélation de la biotine liée à l'extrémité C-terminale, en

présence d'avidine ou de streptavidine couplée à un marqueur de type phosphatase alcaline ou à un isotope radioactif.

- 7.- Utilisation des fragments Fab d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 2 à 5 pour la
- 5 purification d'antigènes par immunoaffinité à l'aide de supports inertes recouverts d'avidine ou de streptavidine, sur lesquels la protéine de fusion Fab-BCCP* est liée par son extrémité biotinylés, le site de reconnaissance de l'antigène, en N-terminal de ladite protéine, étant libre et
- 10 permettant la rétention de l'antigène à partir de toute solution brute dans laquelle il est présent, et ensuite, son élution dans des conditions appropriées.

1 / 2

Figure 1



RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2717499

N° d'enregistrement
national

FA 497021

FR 9403125

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-90 14431 (BIOTECHNOLOGY RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 29 Novembre 1990 * page 15, alinéa 4 - page 18, alinéa 1 *	1-4
D,X	MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol.30, no.16, Novembre 1993 pages 1519 - 1528 ORFANOUDAKIS ET AL. 'Bacterially expressed Fabs of monoclonal antibodies neutralizing tumour necrosis factor alpha in vitro retain full binding and biological activity' * page 1525, colonne de droite, alinéa 1 *	1-4
X	PROTEIN ENGINEERING, vol.6, no.1, Janvier 1993, ENGLAND GB pages 109 - 122 SCHMIDT ET SKERRA 'The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment' * page 116, colonne de gauche, alinéa 3 *	1-4
T	PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol.5, no.5, Octobre 1994, SAN DIEGO, US pages 509 - 517 WEISS ET AL. 'In vivo biotinylated recombinant antibodies: Construction, characterization, and application of a bifunctional Fab-BCCP fusion protein produced in Escherichia coli' * le document en entier *	1-7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.5) C12N C12P C07K G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
25 Novembre 1994		Cupido, M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

SPO FORM 1000 (04.91) (P04C13)